Biochemie der Kohlenhydrate – Vorbereitung

Jeder Versuchsschritt mit dem „Warum“ dahinter, dazu das Vorlesungswissen, das du am Versuchstag und im begleitenden Seminar brauchst. Grundlage ist das Praktikumsskript (S. 9–19); Ergänzungen sind markiert.

1 Der Tag im Überblick

Der Versuchstag hat zwei Experimente und ein begleitendes Seminar, in dem die Ergebnisse besprochen und die Grundlagen der Zuckerchemie wiederholt werden.

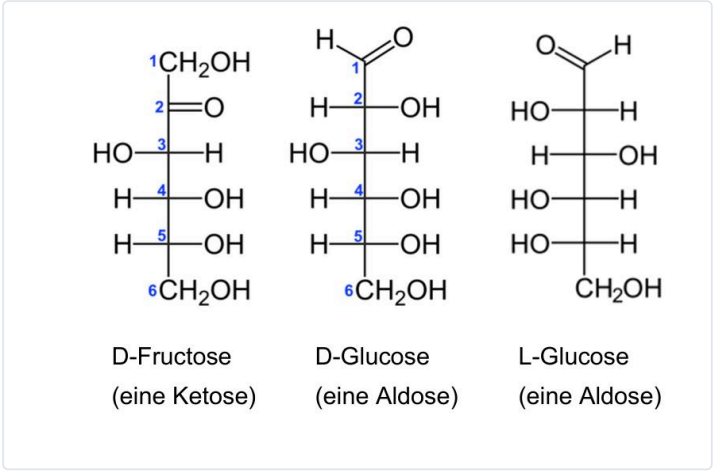
	Experiment 1	Experiment 2
Frage	Welche Zucker sind **reduzierend** – und was ändert sich, wenn man Disaccharide enzymatisch spaltet?	Wie hängt die Aktivität der **Glykogen-Phosphorylase** von Phosphorylierung (a/b) und AMP ab?
Methode	Enzymspaltung (20 min) → Fehling-Probe (Farbe blau/rot)	Enzymreaktion (10 min) → Phosphatnachweis als Molybdänblau → Photometer 720 nm
Ergebnis	qualitativ (Farbtabelle)	quantitativ (Aktivitäten berechnen, Säulendiagramm)

Merke: Mitnehmen: Kittel, Schutzbrille, Taschenrechner, Millimeterpapier (Säulendiagramm), Skript. Teilnahme ist Pflicht (Unterschrift).

2 Hintergrund: Was du über Zucker wissen musst

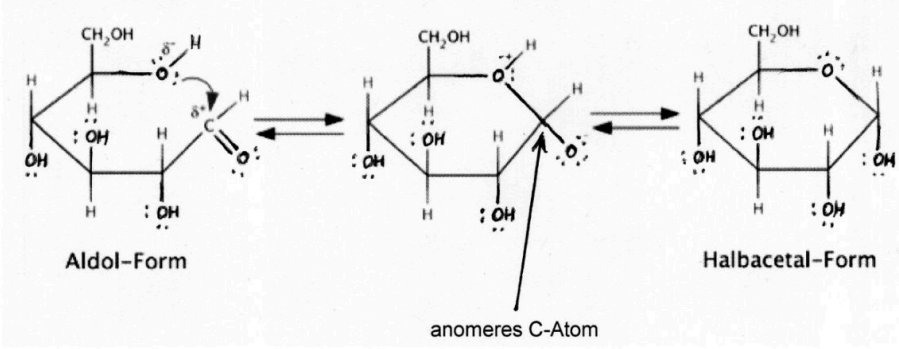
Aldose oder Ketose? Alle Zucker haben ein C-Gerüst mit OH-Gruppen und einer Carbonylgruppe. Sitzt die Carbonylgruppe endständig (C1, Aldehyd), ist es eine Aldose (Glucose, Galactose); sitzt sie am C2 (Keton), eine Ketose (Fructose).

D oder L? In der Fischer-Projektion steht das am höchsten oxidierte C-Atom oben. Entscheidend ist die OH-Gruppe am untersten Stereozentrum (bei Hexosen C5): rechts = D (dexter), links = L (laevus). Physiologisch zählen fast nur D-Zucker; Ausnahme ist die L-Fucose in den AB0-Blutgruppenantigenen.



Praktikumsskript S. 9

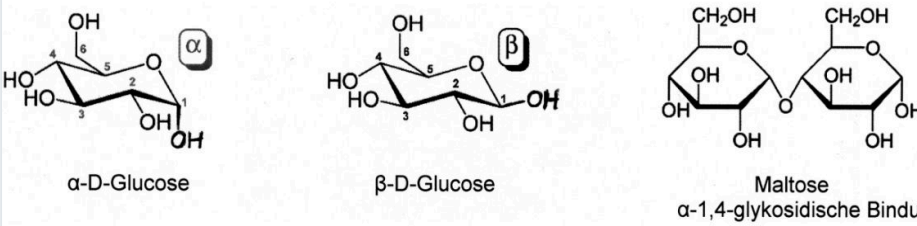
Ringschluss – Halbacetal. In Wasser liegt Glucose fast nur als Ring vor, offenkettig nur zu etwa 0,25 %. Der Sauerstoff der OH-Gruppe an C5 greift das positiv polarisierte C1 der Aldehydgruppe an – es entsteht ein **Halbacetal**. C1 heißt jetzt anomeres C-Atom; seine neue OH-Gruppe kann unten (α) oder oben (β) stehen. Der Ringschluss ist reversibel – das ist der Schlüssel zur Fehling-Probe.



Praktikumsskript S. 10

Disaccharide entstehen, wenn das anomere C-Atom eines Zuckers mit einer OH-Gruppe eines zweiten Zuckers eine **glykosidische Bindung** eingeht (ein Acetal). Ob das Disaccharid noch reduzierend ist, hängt nur davon ab, ob ein anomeres C-Atom frei bleibt:

Disaccharid	Bausteine und Bindung	freies anomeres C?	reduzierend?	Spaltendes Enzym (Darm)
Maltose (Stärkeabbau)	Glucose–α-1,4–Glucose	ja (rechte Glucose = Halbacetal)	**ja**	Maltase (α-Glucosidase); im Versuch: α-Amylase
Lactose (Milchzucker)	Galactose–β-1,4–Glucose	ja (Glucose)	**ja**	Lactase (β-Galactosidase)
Saccharose (Haushaltszucker)	α-D-Glucose–**α,β-1,2**–β-D-Fructose	**nein** – beide anomeren C-Atome gebunden (Vollacetal)	**nein**	Saccharase-Isomaltase (Invertase)



Praktikumsskript S. 11

Reduzierender Zucker heißt: Der Zucker kann (über die Ringöffnung) eine freie Aldehydgruppe bilden. Diese wird leicht zur Carboxylgruppe oxidiert – der Zucker gibt also Elektronen ab und reduziert damit das Oxidationsmittel. Reduzierend sind Glucose, Galactose, Fructose, Maltose und Lactose. **Fructose** ist eine Ketose und trotzdem reduzierend: Im basischen Fehling-Milieu wandelt sie sich über eine Keto-Enol-Tautomerie in eine Aldose um.

Verdauung: Disaccharide werden nicht als solche aufgenommen. Glycosidasen in den Mikrovilli der Dünndarmschleimhaut (Bürstensaum) spalten sie extrazellulär in

Monosaccharide – z. B. Saccharase-Isomaltase und Lactase. α-Amylasen kommen aus Speicheldrüsen und Pankreas. (→ Erdmann VL 02, Kapitel 2 deines Erdmann-Lernskripts; Lactasemangel = Lactoseintoleranz.)

3 Experiment 1 – Schritt für Schritt

1 **Drei Enzymansätze pipettieren (Eppis, 1,5 ml)** · 20 min Reaktion

Ansatz	Substrat (800 µl)	Puffer (200 µl)	Enzym (25 µl)	Inkubation
A	Maltose 100 mg/ml	0,1 M Phosphat, 33 mM NaCl, pH 6,9	α-Amylase	20 min, Raumtemperatur
B	Lactose 50 mg/ml	0,1 M Phosphat, 33 mM NaCl, pH 7,3	β-Galactosidase	20 min, 37 °C (Heizblock)
C	Saccharose 100 mg/ml	0,1 M Na-Acetat, pH 4,5	Invertase	20 min, 55 °C (Heizblock)

Warum verschiedene Puffer und Temperaturen? Jedes Enzym hat sein eigenes pH- und Temperaturoptimum. Die Bedingungen sind so gewählt, dass jedes Enzym in 20 Minuten möglichst viel umsetzt. Der Puffer hält den pH-Wert konstant, das Enzym kommt zuletzt dazu (es startet die Reaktion).

2 **Fehling-Probe ansetzen (9 Plastikreagenzgläser)** · 4 ml Fehling-Reagenz je Glas

Glas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe	Wasser 1 ml	Maltose 1 ml	Lactose 1 ml	Saccharose 1 ml	Fructose 1 ml	Glykogen 0,1 ml	Ansatz A 1 ml	Ansatz B 1 ml	Ansatz C 1 ml

Jedes Glas mit 4 ml Fehling-Reagenz mischen (rauf- und runterpipettieren), dann **15 Minuten bei 60 °C** im Heizblock unter dem Abzug.

Warum diese Gläser? Glas 1 ist die Negativkontrolle (so sieht „blau“ aus). Gläser 2–6 zeigen, welche Zucker an sich reduzierend sind. Gläser 7–9 zeigen, was sich durch die enzymatische Spaltung ändert – Glas 4 und Glas 9 sind das entscheidende Paar.

3 Was in der Fehling-Probe passiert · Redoxreaktion

Im Fehling-Reagenz liegen **Cu^{2+}-Ionen** vor, durch Tartrat (Anion der Weinsäure) komplexiert – sonst würden sie im basischen Milieu als $Cu(OH)_2$ ausfallen. Beim Erhitzen mit einem reduzierenden Zucker läuft eine Redoxreaktion:

1. **Oxidation:** Die Aldehydgruppe wird zur Carbonsäure oxidiert: R–CHO + 2 OH^- → R–COOH + H_2O + 2 e^-
2. **Reduktion:** Cu^{2+} nimmt die Elektronen auf und wird zu Cu^+; es fällt als **rotbraunes Kupfer(I)-oxid (Cu_2O)** aus.

Blau = kein reduzierender Zucker (Cu^{2+}-Komplex bleibt). **Rot/rotbraun** = reduzierender Zucker. Früher wurde die Probe sogar zur quantitativen Glucosebestimmung und Diabetes-Diagnose eingesetzt.

4 Auswertung: Welche Farbe erwartest du? · aus der Theorie abgeleitet

Glas	Probe	erwartet	Begründung
1	Wasser	blau	Negativkontrolle
2	Maltose	**rot**	freies anomeres C → Halbacetal öffnet sich
3	Lactose	**rot**	freies anomeres C an der Glucose
4	Saccharose	**blau**	Vollacetal, kann sich nicht öffnen
5	Fructose	**rot**	Keto-Enol-Tautomerie → Aldose
6	Glykogen	blau (allenfalls schwach)	riesiges Molekül mit nur einem reduzierenden Ende, nur 0,1 ml
7	Ansatz A (Maltose + Amylase)	**rot**	Maltose ist schon selbst reduzierend – das Ergebnis sagt also nichts über die Spaltung
8	Ansatz B (Lactose + β-Gal.)	**rot**	Glucose + Galactose, beide reduzierend
9	Ansatz C (Saccharose + Invertase)	**rot**	**Spaltung** setzt Glucose und Fructose frei – vorher blau (Glas 4), jetzt rot

Merke: Kernaussage des Experiments: **Saccharose wird erst nach der Spaltung durch die Invertase Fehling-positiv.**

Info: Diskussionspunkt fürs Seminar: α-Amylase ist eine Endo-Glykosidase, die Stärke im Inneren der Ketten spaltet – Maltose ist eher ihr *Produkt*. Weil Maltose ohnehin reduzierend ist, kann Ansatz A die Spaltung mit der Fehling-Probe ohnehin nicht zeigen. (Lehrbuchwissen, nicht im Skript.)

Klinik: **Abfall in den Schwermetallabfall** – das Fehling-Reagenz enthält Kupfer.

4 Hintergrund: Glykogen und die Glykogen-Phosphorylase

Glykogen ist die schnell mobilisierbare Speicherform der Glucose, v. a. in Leber und Skelettmuskel. Die Glucose-Einheiten sind wie in der Maltose **α-1,4**-glykosidisch verknüpft, die Verzweigungen **α-1,6**.

Wichtigstes Abbauenzym ist die **Glykogen-Phosphorylase**. Sie spaltet die α-1,4-Bindung nicht hydrolytisch, sondern mit freiem anorganischem Phosphat – eine **Phosphorolyse**. Produkt ist **Glucose-1-phosphat**, und ATP ist nicht beteiligt (das Phosphat stammt aus den Salzionen der Zelle):

$$(\text{Glykogen})_n + P_i \rightleftarrows (\text{Glykogen})_{n-1} + \text{Glucose-1-phosphat}$$

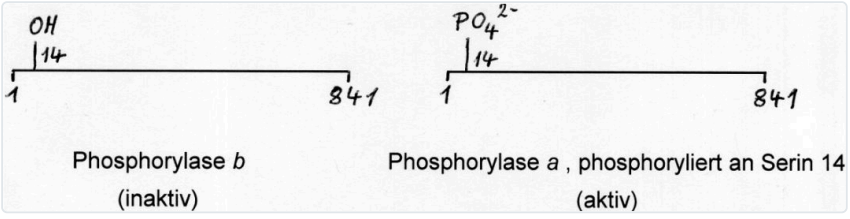
Warum kann die Reaktion rückwärts laufen? Sie ist reversibel; im Reagenzglas liegt das Gleichgewicht sogar auf der Seite des Glykogens. In der Zelle wird Glucose-1-phosphat aber sofort zu Glucose-6-phosphat umgebaut, seine Konzentration bleibt winzig – deshalb läuft in vivo der Abbau. Im Versuch gibt man viel Glucose-1-phosphat dazu, und das Enzym baut Glykogen auf. Das zeigt: Die Richtung einer Reaktion hängt von den Konzentrationen ab.

Regulation – zwei unabhängige Wege:

Weg	Mechanismus	Wirkung
Interkonversion (kovalent)	**Phosphorylase-Kinase** phosphoryliert **Ser14** beider Untereinheiten; **Phosphorylase-Phosphatase** spaltet das Phosphat hydrolytisch wieder ab	**b** (dephosphoryliert, inaktiv) → **a** (phosphoryliert, aktiv)
Allosterie (nicht kovalent)	**AMP** bindet außerhalb des aktiven Zentrums → Konformationsänderung	aktiviert v. a. die **b**-Form; a ist ohnehin aktiv

Weitere Fakten aus dem Skript: Dimer aus zwei identischen Untereinheiten (je 841 Aminosäuren); drei gewebespezifische Isoformen, im Versuch die aus Kaninchen-Skelettmuskel; alle enthalten **Pyridoxalphosphat** (PALP) – hier nur an der Übertragung eines H^+ beteiligt, ohne Bezug zum Aminosäurestoffwechsel.

Info: Physiologischer Sinn (BC I): AMP steigt bei Energiemangel im arbeitenden Muskel – dann soll Glykogen schnell abgebaut werden, auch ohne hormonelles Signal.



Praktikumsskript S. 13

5 Experiment 2 – Schritt für Schritt

1 **Vier Reaktionsansätze (Eppis)** · Phosphorylase a/b ± AMP

	1: a – AMP	2: a + AMP	3: b – AMP	4: b + AMP
AMP	–	100 µl	–	100 µl
Wasser	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl
Glykogen	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Phosphorylase a bzw. b	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

5 min bei 30 °C vorinkubieren, dann je **100 µl Glucose-1-phosphat** zugeben (startet die Reaktion) und **genau 10 min** bei 30 °C im Wasserbad. Dann **500 µl TCA** (Trichloressigsäure).

Warum? Wasser gleicht das fehlende AMP-Volumen aus, damit alle Ansätze gleich groß sind. Das Vorinkubieren bringt alles auf Temperatur. Die Zeit muss exakt stimmen, weil die Aktivität pro Minute berechnet wird. **TCA denaturiert das Enzym** und stoppt die Reaktion schlagartig.

2 **Zwei Leerwerte (LW A, LW B)** · Reihenfolge genau einhalten!

Enzym (a bzw. b) → **zuerst TCA** → dann AMP, Wasser, Glykogen, Glucose-1-phosphat (je 100 µl). Nicht inkubieren.

Warum? Weil das Enzym schon tot ist, bevor die Substrate dazukommen, entsteht hier kein Phosphat durch die Reaktion. Der Leerwert misst nur das Phosphat, das als Verunreinigung ohnehin in den Lösungen steckt – damit eicht man das Photometer auf null.

3 **Zentrifugieren** · 3 min, 12 000 rpm

Das durch TCA gefällte Protein wird abzentrifugiert; im Überstand ist das freigesetzte Phosphat. **Rotor ausbalancieren: 3 Gefäße links, 3 rechts.** Währenddessen 6 Reagenzgläser vorbereiten: 1,8 ml Wasser + 2,0 ml NH_4^+-Molybdat + 0,2 ml Reduktionslösung (ANSA).

4 **Phosphatnachweis als Molybdänblau** · Photometer 720 nm

Je **0,5 ml Überstand** in die Gläser, vorsichtig schwenken, 10 min bei Raumtemperatur, dann 1 ml 2,9 M Na-Acetat. Etwa 3 ml in eine Küvette und die Extinktion bei **720 nm** messen: zuerst mit **LW A** auf null eichen und die a-Proben messen, dann mit **LW B** eichen und die b-Proben messen.

Warum? Phosphat bildet mit Molybdat einen Komplex, den die Reduktionslösung zu einem tiefblauen Farbstoff (**Molybdänblau**) reduziert. Je mehr Phosphat, desto blauer – nach **Lambert-Beer** ($E = \varepsilon \cdot c \cdot d$) ist die Extinktion proportional zur Konzentration. Über die Phosphat-Eichkurve wird aus der Extinktion die Phosphatmenge in nmol.

6 Auswertung und Rechnung

Volumenaktivität. Aus der Eichkurve bekommst du nmol Phosphat pro Probe. Umrechnung laut Skript:

Faktor	Grund
× 10	eingesetzt wurden 100 µl Enzym, angegeben wird pro 1 ml
× 2	gemessen wurde nur die Hälfte des Ansatzes (0,5 von ca. 1 ml Überstand)
× 1/10	10 min Inkubation, Aktivität pro Minute
× 1/1000	nmol → µmol

$$\text{Volumenaktivität } [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}] = \text{nmol Phosphat} \times 0{,}002$$

Relative Aktivität: Ansatz 1 (a ohne AMP) = 100 %, die anderen in Prozent davon.

Spezifische Aktivität = Volumenaktivität ÷ Proteinkonzentration.
Proteinkonzentration: **Phosphorylase a 35 µg/ml = 0,035 mg/ml**, **Phosphorylase b 25 µg/ml = 0,025 mg/ml**.

Beispiel (ausgedachte Zahl): 50 nmol Phosphat → 50 × 0,002 = 0,1 µmol·min^{-1}·ml^{-1} → bei a: 0,1 ÷ 0,035 ≈ 2,9 µmol·min^{-1}·mg^{-1}

Ergebnisse als **Säulendiagramm** auf Millimeterpapier.

Merke: Erwartung: a ohne AMP hoch, a mit AMP kaum anders; b ohne AMP niedrig, **b mit AMP deutlich höher**. Damit zeigst du beide Regulationswege: Interkonversion (a vs. b) und allosterische Aktivierung (AMP bei b).

Klinik: Sicherheit: TCA verätzt Haut und Augen – sofort mit viel Wasser abspülen. Fehling-Abfall in den Schwermetallabfall. Zentrifuge immer ausbalancieren.

Fragen fürs Seminar

Erst selbst beantworten, dann die Antworten auf der nächsten Seite ansehen.

1. Warum ist Saccharose nicht reduzierend, Maltose aber schon?
2. Warum wird Fructose in der Fehling-Probe rot, obwohl sie eine Ketose ist?
3. Was passiert chemisch in der Fehling-Probe?
4. Welches Ergebnis ist das wichtigste in Experiment 1?
5. Warum heißt das Enzym Phosphorylase und nicht Hydrolase?
6. Warum baut die Phosphorylase im Versuch Glykogen auf, in der Zelle aber ab?
7. Was ist der Unterschied zwischen Phosphorylase a und b, und was macht AMP?
8. Wozu dienen die Leerwerte, und warum kommt TCA zuerst?
9. Woher kommt der Faktor 0,002?

Antworten

1. **Warum ist Saccharose nicht reduzierend, Maltose aber schon?**
   In der Saccharose sind die anomeren C-Atome beider Zucker an der α,β-1,2-Bindung beteiligt (Vollacetal) – der Ring kann sich nicht öffnen, es entsteht keine Aldehydgruppe. In der Maltose bleibt das anomere C der zweiten Glucose frei (Halbacetal) und kann sich öffnen.
2. **Warum wird Fructose in der Fehling-Probe rot, obwohl sie eine Ketose ist?**
   Im basischen Milieu wandelt sie sich über die Keto-Enol-Tautomerie in eine Aldose um, deren Aldehydgruppe oxidiert wird.
3. **Was passiert chemisch in der Fehling-Probe?**
   Redoxreaktion: Die Aldehydgruppe wird zur Carbonsäure oxidiert, Cu^{2+} (durch Tartrat komplexiert) wird zu Cu^{+} reduziert und fällt als rotbraunes Cu_2O aus.
4. **Welches Ergebnis ist das wichtigste in Experiment 1?**
   Saccharose ist vor der Spaltung Fehling-negativ (blau), nach der Spaltung durch die Invertase positiv (rot) – weil Glucose und Fructose frei werden.
5. **Warum heißt das Enzym Phosphorylase und nicht Hydrolase?**
   Es spaltet die α-1,4-Bindung mit anorganischem Phosphat (Phosphorolyse), nicht mit Wasser. Produkt ist Glucose-1-phosphat, ATP wird nicht gebraucht.
6. **Warum baut die Phosphorylase im Versuch Glykogen auf, in der Zelle aber ab?**
   Die Reaktion ist reversibel. Im Versuch ist viel Glucose-1-phosphat da, also läuft sie Richtung Glykogen. In der Zelle wird G1P sofort zu G6P umgesetzt, seine Konzentration bleibt niedrig – das zieht die Reaktion Richtung Abbau.
7. **Was ist der Unterschied zwischen Phosphorylase a und b, und was macht AMP?**
   a ist an Ser14 phosphoryliert und aktiv, b ist dephosphoryliert und weniger aktiv (Interkonversion durch Kinase/Phosphatase). AMP aktiviert allosterisch v. a. die b-Form.
8. **Wozu dienen die Leerwerte, und warum kommt TCA zuerst?**
   Sie erfassen Phosphat, das als Verunreinigung in den Lösungen steckt. Weil TCA das Enzym vorher denaturiert, entsteht dort kein Phosphat durch die Reaktion – so wird nur der Hintergrund gemessen.
9. **Woher kommt der Faktor 0,002?**
   ×10 (100 µl → 1 ml), ×2 (nur halber Ansatz gemessen), ×1/10 (10 min → pro Minute), ×1/1000 (nmol → µmol).

Quellen: Praktikumsskript Biochemie/Molekularbiologie WS 2026/27 (Erdmann, Girzalsky), Versuch „Biochemie der Kohlenhydrate“, S. 9–19 · Erdmann VL 02 Kohlenhydrate (Disaccharide, Verdauung) · BC I Glykogenstoffwechsel. Abbildungen aus dem Praktikumsskript.